

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) RU (11) **2 612 132** (13) C2

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ
(51) МПК

[G01N 27/00 \(2006.01\)](#)[G01N 27/26 \(2006.01\)](#)[G01N 27/30 \(2006.01\)](#)[G01N 31/00 \(2006.01\)](#)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

Статус: действует (последнее изменение статуса: 17.03.2017)
Пошлина: учтена за 3 год с 17.07.2017 по 16.07.2018

(21)(22) Заявка: [2015129975](#), 16.07.2015(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.07.2015

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.07.2015

(43) Дата публикации заявки: 18.01.2017 Бюл. № [2](#)(45) Опубликовано: [02.03.2017](#) Бюл. № [7](#)

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: Yoshida Y., Itoh N., Saito Y., Hayakawa M, Niki E. Application of water-soluble radical initiator, 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] dihydrochloride, to a study of oxidative stress // Free Radic Res. 2004. 38 (4): 375-384. Л.А Хамидуллина, А.И.Матерн. Разработка нового метода потенциометрического изучения антирадикальной активности на модели генерируемого пероксидного радикала. Достижения в химии и химической технологии. Труды научной конференции. Екатеринбург-УрФу. 2011. WO 2005022116, 10.03.2005.

Адрес для переписки:

620002, г. Екатеринбург, К-2, Мира, 19,
УрФУ, центр интеллектуальной
собственности, Маркс Татьяна
Владимировне

(72) Автор(ы):

Иванова Алла Владимировна (RU),
Герасимова Елена Леонидовна (RU),
Газизуллина Елена Ринатовна (RU),
Матерн Анатолий Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего
образования "Уральский федеральный
университет имени первого Президента
России Б.Н. Ельцина" (RU)

(54) СПОСОБ ПОТЕНЦИОМЕТРИЧЕСКОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СКОРОСТИ
ГЕНЕРИРОВАНИЯ ПЕРОКСИЛЬНЫХ РАДИКАЛОВ

(57) Реферат:

Изобретение относится к новому способу определения скорости генерирования пероксильных радикалов. Технический результат: разработан новый способ определения скорости генерирования пероксильных радикалов, который повышает точность, достоверность и воспроизводимость результатов, а также расширяет круг исследуемых веществ и используемых реагентов. 1 з.п. ф-лы, 4 ил., 1 пр.

Изобретение относится к области физико-химических методов исследования радикальных реакций, в частности к способу определения скорости генерирования пероксильных радикалов. Способ может быть использован для количественного определения скорости генерирования пероксильных радикалов в растворе.

Известен способ изучения распада радикальных инициаторов и генерирования радикалов методами высокоэффективной жидкостной хроматографии и tandemной масс-спектрометрии в сочетании с жидкостной хроматографией [Werber J., Wang Y.J., Milligan M., Li X., Ji J.A. Analysis of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions // J. Pharm. Sci. 2011. 100(8): 3307-3315].

Недостатками данного способа являются сложность техники эксперимента, использование дорогостоящего оборудования и реактивов, а также высокие требования к исполнителю эксперимента в связи со сложностью интерпретации получаемых результатов.

Известен способ определения концентрации и скорости генерирования пероксильных радикалов, образующихся вследствие распада радикальных азоинициаторов методом электронного парамагнитного резонанса с использованием спиновых ловушек свободных радикалов, например 5,5-диметил-1-пирролин-N-оксида и 2,2-диметил-4-фенилимидазол-1-оксида [Kraiev A.G., Bigelow D.J. Comparison of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride (AAPH) and 2,2'-azobis(2,4-dimethylvaleronitrile)(AMVN) as free radical initiators: a spin-trapping study // J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1996. 2: 747-754].

Недостатками данного способа также являются сложность техники эксперимента и использование дорогостоящего оборудования, а также специфических реактивов, не являющихся общедоступными.

Известен способ определения скорости генерирования пероксильных радикалов методом активированной хемилюминесценции с использованием в качестве люминофора люминола. В данном способе регистрируется увеличение интенсивности свечения люминола за счет взаимодействия с генерируемыми пероксильными радикалами [Krasowska A., Rosiak D., Szkapiak K., Lukaszewicz M. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds // Current Topics in Biophysics. 2000. 24(2): 89-95].

К недостаткам данного способа можно отнести то, что спектрофотометрическая регистрация сигнала также ограничивает измерения в окрашенных жидкостях, и то, что результаты, получаемые данным методом, представлены в относительных единицах свечения.

Наиболее близким решением служит способ определения скорости генерирования пероксильных радикалов, также образующихся за счет распада радикальных инициаторов, спектрофотометрическим методом с помощью измерения концентрации акцептора свободных радикалов пирогаллового красного (пирогаллосульфоталеина) - красителя, обладающего максимумом поглощения при 540 нм [Yoshida Y., Itoh N., Saito Y., Hayakawa M., Niki E. Application of water-soluble radical initiator, 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-yl)propane] dihydrochloride, to a study of oxidative stress // Free Radic Res. 2004. 38 (4): 375-84].

К недостаткам данного способа относится то, что спектрофотометрический способ измерения сигнала не позволяет проводить измерения в окрашенных объектах, обладает недостаточной чувствительностью и точностью.

Задачей, решаемой данным изобретением, служит повышение точности, достоверности и воспроизводимости результатов, расширение круга исследуемых веществ и используемых реагентов.

Сущность заявляемого способа заключается в том, что определение скорости генерирования пероксильных радикалов проводят по изменению концентрации акцептора свободных радикалов, которая сопровождается изменением потенциала, регистрируемого при взаимодействии акцептора с генерируемыми радикалами, возникающими при термическом распаде радикального инициатора в растворе.

В качестве акцептора свободных радикалов используют восстановленную форму металла в составе комплексного соединения. При взаимодействии радикалов с восстановленной формой металла в комплексе образуется окисленная форма металла в комплексе и возникает обратимая электрохимическая система, потенциал которой зависит от соотношения окисленной и восстановленной форм. Пероксильные радикалы взаимодействуют с восстановленной формой металла в комплексе, что сопровождается постепенным уменьшением концентрации восстановленной формы металла по реакциям (1-2) и, соответственно, увеличением окислительно-восстановительного потенциала электрохимической системы согласно уравнению Нернста:

$$E_{\frac{[Me^{Ox}L]}{[Me^{Red}L]}} = E_{\frac{[Me^{Ox}L]}{[Me^{Red}L]}}^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{[Me^{Ox}L]}{[Me^{Red}L]}$$

$$RO_2^{\cdot} + e^- \rightarrow RO_2^- \quad (1)$$

$$[Me^{Red}L] - e^- = [Me^{Ox}L] \quad (2)$$

Расчет скорости производят по следующим формулам:

$$W_i = -d\{C([Me^{Red}L])\}/dt,$$

где W_i - скорость генерирования радикалов, $м \cdot с^{-1}$;

$C([Me^{Red}L])$ - концентрация восстановленной формы реагента, М.

Для расчета кинетики уменьшения концентрации восстановленной формы реагента $[Me^{Red}L]$ последнюю в каждый момент времени оценивают по формуле:

$$C([Me^{Red}L]) = C^0([Me^{Red}L]) - \frac{C^0([Me^{Red}L])(h - \varphi)}{h \cdot (1 - \varphi)},$$

где

$$\varphi = 10^{(E_1 - E_2) \cdot n \cdot F / R \cdot T - 2,303};$$

$C^0([Me^{Red}L])$ - начальная концентрация восстановленной формы реагента, М;

E_1 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_1 = t$, В;

E_2 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_2 = ht$, В;

h - отношение t_1 к t_2 ;

n - число электронов, участвующих в процессе, $n=1$;

F - постоянная Фарадея, равная $96485 \text{ Кл} \cdot \text{моль}^{-1}$;

R - универсальная газовая постоянная, равная $8,31 \text{ Дж}/(\text{моль} \cdot \text{К})$;

T - абсолютная температура, К.

В качестве реагентов могут быть использованы комплексные соединения металлов переменной валентности, например комплекс железа (II) с ЭДТА $[Fe(II)-EDTA]$, комплекс железа (II) с о-фенантролином $[Fe(Phen)_3]^{2+}$, $K_4[Fe(CN)_6]$, $K_4[Mn(CN)_6]$, $K_4[Mo(CN)_8]$, $[Fe(SCN)_2]$, также комплексные соли металлов переменной валентности с органическими лигандами, например, тетраэтиламмония гексацианоферрат (II), тетраэтиламмония тетрахлороферрат (II), $Fe(II)-TPTZ$.

В качестве инициаторов, являющихся источником пероксильных радикалов, могут быть использованы азосоединения, например 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида (AAPH), 2,2'-азобис[2-(2-имидазолин-2-ил)пропан]дигидрохлорид (AIPN) и др.

Рабочий электрод может быть изготовлен из платины, электродом сравнения может служить стандартный хлорсеребряный электрод.

Указанные отличия существенны. Использование потенциометрического способа регистрации аналитического сигнала позволяет проводить анализ окрашенных объектов, а также увеличить чувствительность и точность метода за счет использования электрохимической детекции аналитического сигнала.

В настоящее время из патентной и научно-технической литературы неизвестен способ определения скорости генерирования пероксильных радикалов в заявляемой совокупности признаков. Впервые применена потенциометрия для решения этой задачи.

На фиг. 1 представлена зависимость потенциала от времени при совместном инкубировании радикального инициатора 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида (AAPH) с $K_4[Fe(CN)_6]$ с при 37°C .

На фиг. 2 представлена зависимость потенциала от времени при совместном инкубировании радикального инициатора 2,2'-азобис[2-(2-имидазолин-2-ил)пропан]дигидрохлорида (AIPN) с $[Fe(II)-EDTA]$ с при 37°C .

На фиг. 3 представлена зависимость потенциала от времени при совместном инкубировании радикального инициатора 2,2'-азобис(2-метилпропионамидин) дигидрохлорида (AAPH) с $[Fe(II)-EDTA]$ при 42°C .

На фиг. 4 представлена зависимость потенциала от времени при совместном инкубировании радикального инициатора 2,2'-азобис[2-(2-имидазолин-2-ил)пропан]дигидрохлорида (AIPN) с $[Fe(Phen)_3]^{2+}$ с при 37°C .

Способ иллюстрируется следующими примерами.

Пример 1

В 4,9 мл водного раствора, находящегося в термостатируемой ячейке при 37°C, содержащего 0,1 М радикальный инициатор ААРН, вносят 0,1 мл 0,0125 М раствор $K_4[Fe(CN)_6]$. Затем опускают рабочий электрод и электрод сравнения. Измеряют скорость изменения потенциала.

Изменение потенциала при этом происходит в результате протекания химической реакции в растворе:



Результаты измерений приведены на фиг. 1.

Кинетику уменьшения концентрации $K_4[Fe(CN)_6]$ в каждый момент времени оценивают по формуле:

$$C(K_4[Fe(CN)_6]) = C^0([K_4[Fe(CN)_6]]) - \frac{C^0(K_4[Fe(CN)_6])(h - \varphi)}{h \cdot (1 - \varphi)}$$

где $\varphi = 10^{(E_1 - E_2)nF/RT - 2,303}$;

$C^0(K_4[Fe(CN)_6])$ - начальная концентрация восстановленной формы реагента, М;

$C(K_4[Fe(CN)_6])$ - текущая концентрация восстановленной формы реагента в каждый момент времени, М;

E_1 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_1 = t$, В;

E_2 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_2 = ht$, В;

h - отношение t_1 к t_2 .

Скорость генерирования равна скорости уменьшения концентрации $K_4[Fe(CN)_6]$.

$W_i = -d\{C(K_4[Fe(CN)_6])\}/dt$,

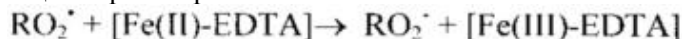
где W_i - скорость генерирования радикалов, $м \cdot с^{-1}$.

Расчет показывает, что скорость генерирования радикалов равна $1,59 \cdot 10^{-7} м \cdot с^{-1}$.

Пример 2

В 4,9 мл водного раствора, находящегося в термостатируемой ячейке при 37°C, содержащего 0,15 М радикальный инициатор АІРН, вносят 0,1 мл 0,015 М раствор $[Fe(II)-EDTA]$. Затем опускают рабочий электрод и электрод сравнения. Измеряют скорость изменения потенциала.

Изменение потенциала при этом происходит в результате протекания химической реакции в растворе:



Результаты измерений приведены на фиг. 2.

Кинетику уменьшения концентрации $[Fe(II)-EDTA]$ в каждый момент времени оценивают по формуле:

$$C([Fe(II) - EDTA]) = C^0([Fe(II) - EDTA]) - \frac{C^0([Fe(II) - EDTA])(h - \varphi)}{h \cdot (1 - \varphi)},$$

где $\varphi = 10^{(E_1 - E_2)nF/RT - 2,303}$;

$C^0([Fe(II)-EDTA])$ - начальная концентрация восстановленной формы реагента, М;

$C([Fe(II)-EDTA])$ - текущая концентрация восстановленной формы реагента в каждый момент времени, М;

E_1 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_1 = t$, В;

E_2 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_2 = ht$, В;

h - отношение t_1 к t_2 .

Скорость генерирования равна скорости расходования $[Fe(II)-EDTA]$.

$W_i = -d\{C([Fe(II)-EDTA])\}/dt$,

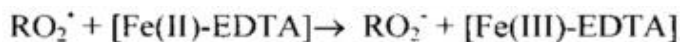
где W_i - скорость генерирования радикалов, $м \cdot с^{-1}$.

Расчет показывает, что скорость генерирования радикалов равна $3,94 \cdot 10^{-7} м \cdot с^{-1}$.

Пример 3

В 4,9 мл водного раствора, находящегося в термостатируемой ячейке при 42°C, содержащего 0,1 М радикальный инициатор ААРН, вносят 0,1 мл 0,0125 М раствор $[Fe(II)-EDTA]$. Затем опускают рабочий электрод и электрод сравнения. Измеряют скорость изменения потенциала.

Изменение потенциала при этом происходит в результате протекания химической реакции в растворе:



Результаты измерений приведены на фиг. 3.

Кинетику уменьшения концентрации $[Fe(II)-EDTA]$ в каждый момент времени оценивают по формуле:

$$C([Fe(II)-EDTA]) = C^0([Fe(II)-EDTA]) - \frac{C^0([Fe(II)-EDTA])(h-\varphi)}{h \cdot (1-\varphi)},$$

где $\varphi = 10^{(E_1-E_2)nF/RT-2,303}$;

$C^0([Fe(II)-EDTA])$ - начальная концентрация восстановленной формы реагента, М;

$C([Fe(II)-EDTA])$ - текущая концентрация восстановленной формы реагента в каждый момент времени, М;

E_1 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_1=t$, В;

E_2 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_2=ht$, В;

h - отношение t_1 к t_2 .

Расчет показывает, что скорость генерирования радикалов равна $3,67 \cdot 10^{-7} \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$.

Пример 4

В 4,9 мл водного раствора, находящегося в термостатируемой ячейке при 37°C , содержащего 0,1 М радикальный инициатор AIPN, вносят 0,1 мл 0,015 М раствор $[Fe(Phen)_3]^{2+}$. Затем опускают рабочий электрод и электрод сравнения. Измеряют скорость изменения потенциала.

Изменение потенциала при этом происходит в результате протекания химической реакции в растворе:



Результаты измерений приведены на фиг. 4.

Кинетику уменьшения концентрации $[Fe(Phen)_3]^{2+}$ в каждый момент времени оценивают по формуле:

$$C([Fe(Phen)_3]^{2+}) = C^0([Fe(Phen)_3]^{2+}) - \frac{C^0([Fe(Phen)_3]^{2+})(h-\varphi)}{h \cdot (1-\varphi)},$$

где $\varphi = 10^{(E_1-E_2)nF/RT-2,303}$;

$C^0([Fe(Phen)_3]^{2+})$ - начальная концентрация восстановленной формы реагента, М;

$C([Fe(Phen)_3]^{2+})$ - текущая концентрация восстановленной формы реагента в каждый момент времени, М;

E_1 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_1=t$, В;

E_2 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_2=ht$, В;

h - отношение t_1 к t_2 .

Скорость генерирования равна скорости уменьшения концентрации $[Fe(Phen)_3]^{2+}$.

$$W_i = -d\{C([Fe(Phen)_3]^{2+})\}/dt,$$

где W_i - скорость генерирования радикалов, $\text{м} \cdot \text{с}^{-1}$.

Расчет показывает, что скорость генерирования радикалов равна $5,43 \cdot 10^{-7} \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$.

Формула изобретения

1. Способ определения скорости генерирования пероксильных радикалов, включающий генерацию пероксильных радикалов на модели термического разложения азоинициатора с помощью изменения концентрации акцептора свободных радикалов, отличающийся тем, что в качестве акцептора свободных радикалов используют восстановленную форму реагента и регистрируют значение окислительно-восстановительного потенциала во времени, затем рассчитывают концентрацию восстановленной формы реагента $[Me^{Red}L]$ по формуле:

$$C([Me^{Red}L]) = C^0([Me^{Red}L]) - \frac{C^0([Me^{Red}L])(h-\varphi)}{h \cdot (1-\varphi)}, \text{ где } \varphi = 10^{(E_1-E_2)nF/RT-2,303}$$

$C([Me^{Red}L])$ - концентрация восстановленной формы реагента в каждый момент времени, М;

$C^0([Me^{Red}L])$ - начальная концентрация восстановленной формы реагента, М;

E_1 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_1=t$, В;

E_2 - потенциал, измеренный через промежуток времени $t_2=ht$, В;

h - отношение t_1 к t_2 ;

n - число электронов, участвующих в процессе, $n=1$;

F - постоянная Фарадея, равная $96485 \text{ Кл} \cdot \text{моль}^{-1}$;

R - универсальная газовая постоянная, равная $8,31 \text{ Дж}/(\text{моль} \cdot \text{К})$;

T - абсолютная температура, К,

а скорость реакции генерирования пероксильных радикалов рассчитывают по формуле:

$$W_i = -d\{C([Me^{Red}L])\}/dt,$$

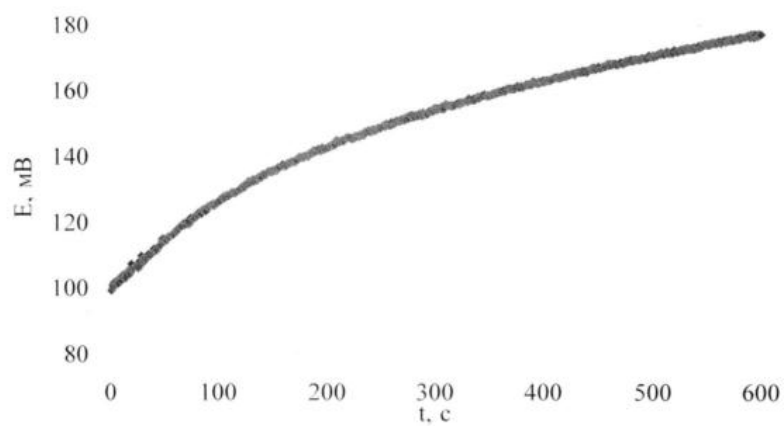
где W_i - скорость генерирования радикалов, $\text{м} \cdot \text{с}^{-1}$.

$d\{C([Me^{Red}L])\}$ - изменение концентрации восстановленной формы реагента, М;

dt - промежуток времени, за который изменилась концентрация восстановленной формы реагента, с.

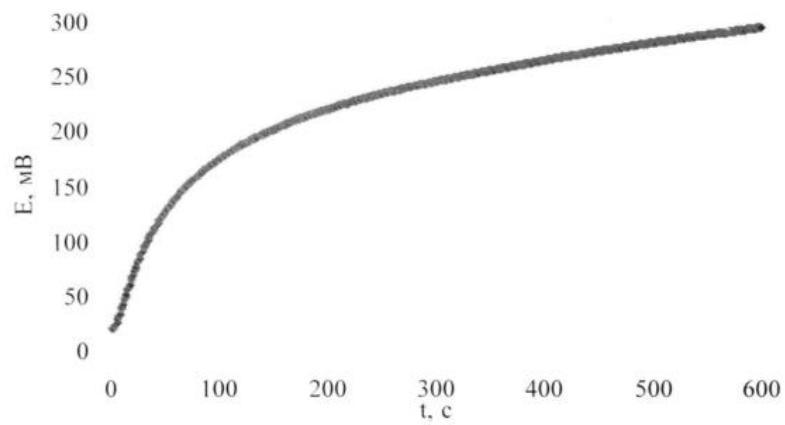
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что в качестве восстановленной формы реагента используют $[Fe(II)\text{-EDTA}]$, $[Fe(Phen)_3]^{2+}$, $K_4[Fe(CN)_6]$, $K_4[Mn(CN)_6]$, $K_4[Mo(CN)_8]$, $[Fe(SCN)_2]$, тетраэтиламмония гексацианоферрат (II), тетраэтиламмония тетрахлоферрат (II), $Fe(II)\text{-TPTZ}$.

Способ потенциометрического
определения скорости
генерирования пероксильных
радикалов



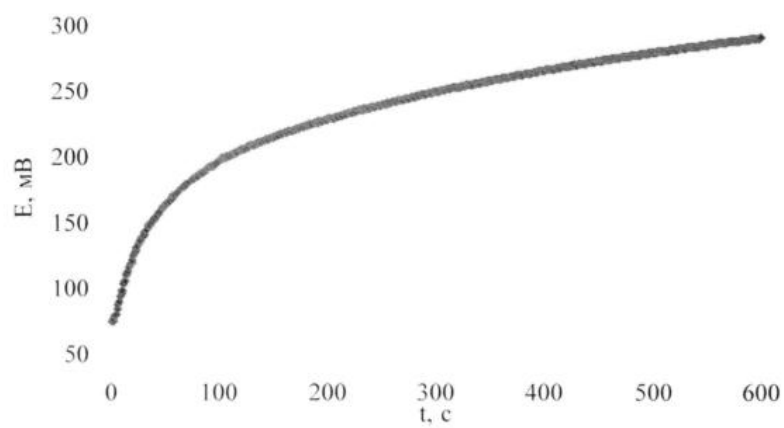
Фиг.1

Способ потенциометрического
определения скорости
генерирования пероксильных
радикалов



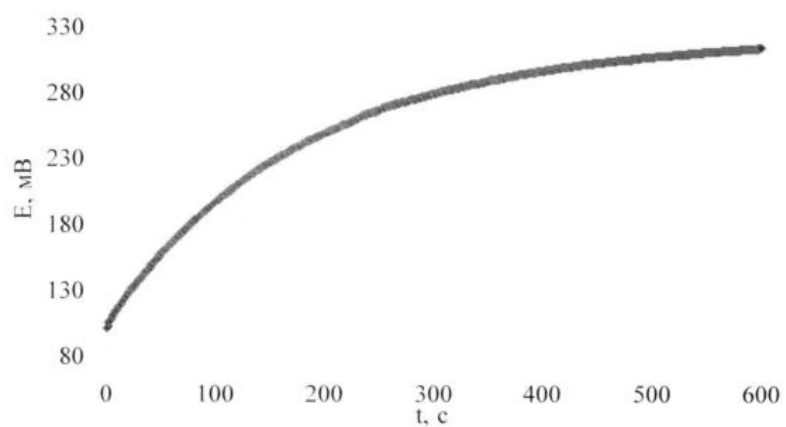
Фиг.2

Способ потенциометрического
определения скорости
генерирования пероксильных
радикалов



Фиг.3

Способ потенциометрического
определения скорости
генерирования пероксильных
радикалов



Фиг.4